

Aus dem Hygiene-Institut der Universität  
Marburg a. d. Lahn  
Direktor: Prof. Dr. med. R. Siebert

---

Mitochondriale DNS-Synthese in lymphoblastoiden Zellen  
nach lytischer Infektion mit Herpes Simplex Virus Typ 1  
und abortiver Infektion mit Epstein-Barr Virus

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der gesamten Medizin

dem Fachbereich der Humanmedizin der  
Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von

Hans-Werner Freise  
aus Regensburg

Marburg 1977

1978

---

Herstellung: Erhardi Druck GmbH, Regensburg



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41551902\\_0064](https://archive.org/details/IA41551902_0064)

Aus dem Hygiene-Institut der Universität  
Marburg a.d. Lahn  
Direktor: Prof.Dr.med.R. Siebert

---

Mitochondriale DNS-Synthese in lymphoblastoiden Zellen  
nach lytischer Infektion mit Herpes Simplex Virus Typ 1  
und abortiver Infektion mit Epstein-Barr Virus

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der  
Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von

Hans-Werner Freise  
aus Regensburg

Marburg 1977



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin  
der Universität Marburg am 31. März 1978  
Dekan: Prof.Dr.med. F. Neurath  
Referent: Dr.med.habil. K. Radsak  
Correferent: Prof.Dr.med. R. Siegert

# INHALTSVERZEICHNIS

|                                                                                     | Seite |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 1. Einleitung                                                                       | 1     |
| 2. Material und Methoden                                                            | 4     |
| 2.1. Zellkulturen                                                                   | 4     |
| 2.1.1. Raji-Zellen                                                                  | 4     |
| 2.1.2. HR-1K-Zellen                                                                 | 4     |
| 2.2. Virus                                                                          | 4     |
| 2.2.1. Herpes Simplex Virus (HSV)                                                   | 4     |
| 2.2.2. Titration von HSV                                                            | 5     |
| 2.2.3. Epstein-Barr Virus (EBV)                                                     | 6     |
| 2.3. Infektion von Raji-Zellen                                                      | 6     |
| 2.3.1. mit HSV                                                                      | 6     |
| 2.3.2. mit EBV                                                                      | 7     |
| 2.4. Immunfluoreszenz                                                               | 7     |
| 2.4.1. mit HSV infizierten Zellen                                                   | 7     |
| 2.4.2. mit EBV infizierten Zellen                                                   | 8     |
| 2.5. Darstellung von nukleärer und mitochondrialer DNS im Dichtegradienten          | 8     |
| 2.5.1. Nukleäre und virale DNS                                                      | 9     |
| 2.5.2. mitochondriale DNS                                                           | 11    |
| 2.6. Bestimmung der Dichte im CsCl-Gradienten                                       | 11    |
| 2.7. Bestimmung der säurelöslichen Radioaktivität                                   | 11    |
| 2.8. Bestimmung der Zellzahl                                                        | 12    |
| 2.9. Proteinbestimmungen                                                            | 12    |
| 2.10. Versuchsanordnung                                                             | 12    |
| 3. Ergebnisse                                                                       | 15    |
| 3.1. Untersuchungen zur zelleigenen DNS-Synthese in mit HSV infizierten Raji-Zellen | 15    |

|                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1.1. Kern-DNS-Synthese                                                                                    | 15 |
| 3.1.2. Mitochondriale DNS-Synthese                                                                          | 15 |
| 3.2. Untersuchungen zur zelleigenen DNS-Synthese in mit EBV infizierten Raji-Zellen                         | 19 |
| 3.2.1. Kern-DNS-Synthese                                                                                    | 19 |
| 3.2.2. Mitochondriale DNS-Synthese                                                                          | 19 |
| 3.3. Untersuchungen zur zellgebundenen säurelöslichen Radioaktivität in mit HSV bzw. EBV infizierten Zellen | 22 |
| 4. Diskussion                                                                                               | 24 |
| 5. Zusammenfassung                                                                                          | 28 |
| 6. Literatur                                                                                                | 29 |

## 1. EINLEITUNG

Der Nachweis von DNS in Mitochondrien konfrontierte den Zellbiologen mit dem Problem der zellulären Regulation einer extrachromosomalen genetischen Information in eukaryoten Zellen. Intensive Untersuchungen in vielen Laboratorien der Welt haben diesbezüglich während der vergangenen 15 Jahre eine kaum noch überschaubare Menge an Informationen geliefert.

Man weiß heute, daß niedrigere Eukaryonten ca. fünfmal mehr mitochondriale DNS besitzen als animale Zellen (1). Weiterhin wurde festgestellt, daß der Anteil der mitochondrialen DNS einer tierischen Zelle an der gesamten Zell-DNS nur ca. 0,1% beträgt (18). Als mitochondriales Genprodukt ist eine mitochondrienspezifische Ribosomen-RNS beschrieben worden, und möglicherweise liegen noch eine Messenger- und Transfer-RNS vor (24). Der Anteil der wahrscheinlich mitochondrienkodierten Proteine ist im Verhältnis zu den Gesamtkonstituenten der Mitochondrien mit weniger als 10% als sehr gering erkannt worden. Für die "Assembly" der in der Innenmembran lokalisierten Atmungsfermente besitzen sie jedoch eine Schlüsselfunktion (2;23). Zur Zeit scheint es, zumindest bei niederen Eukaryonten, noch eine Streitfrage zu sein, ob diese Assemblyproteine in den Mitochondrien von zytoplasmatischer oder mitochondrialer Messenger-RNS translatiert werden (14).

Dieser kurze Überblick macht deutlich, daß Mitochondrien eine zumindest partielle Autonomie im Gesamtgefüge der Zelle besitzen.

Zahlreiche Untersuchungen sind während der letzten Jahre unternommen worden, um die Rolle der Mitochondrien bei Tumorerkrankungen zu analysieren. Während ein morpho-

logischer Unterschied zwischen Tumorzellmitochondrien und Mitochondrien von "Normalzellen" nicht zu bestreiten ist, bleibt es Spekulation, ob diese morphologische Alteration die Folge einer nukleo-zytoplasmatischen oder mitochondrialen Regulation ist, solange keine biochemischen Daten die eine oder andere Ansicht stützen.

Biochemische Korrelate für die Beeinflussung der Mitochondrien durch tumorinduzierende Agentien sind in der Literatur verschiedentlich beschrieben worden. Wie die Untersuchungen von NASS zeigen, werden z.B. durch eine Infektion mit Rous Sarcoma Virus typische Veränderungen (Di-, Tri-, Oligomere) der mitochondrialen DNS hervorgerufen (19). Die elektronenmikroskopischen Ergebnisse von LUNGER lassen sogar vermuten, daß RNS-Tumerviren mitunter auch in Mitochondrien vermehrt werden können (17). Die Befunde von KARA et al., die auf derselben Ebene liegen, werden von diesen Autoren dahingehend interpretiert, daß RNS-Tumerviren eine mitochondrien-assoziierte Phase bei der Reifung durchlaufen (12).

Weniger Informationen liegen über eine Beteiligung der Mitochondrien am Transformationsprozess für DNS-Tumerviren vor. Für SV 40- und Polyomavirus sind lediglich Analysen der mitochondrialen DNS-Synthese nach Infektion von permissiblen Zellkulturen bekannt (15, 26). Die zelluläre Infektion mit diesen Agentien führt nicht nur zu einer Induktion der nukleären, sondern auch der mitochondrialen DNS-Synthese (26). Auch nach Infektion von HeLa-Zellen mit Herpes Simplex Virus (Typ 1) kommt es initial zu einer Aktivierung der mitochondrialen DNS-Synthese (22). Allerdings steht dieser Stimulierung eine Hemmung der Kern-DNS-Synthese gegenüber (11).

Diese Beobachtungen an HeLa-Zellen sollen in der vorliegenden Arbeit an einem anderen Zellsystem nachgeprüft und ergänzt werden. Für die Versuche wurden permanente menschliche Lymphoblastenkulturen gewählt, die mit Herpes Simplex Virus Typ 1 (HSV 1) infiziert wurden. Neben dieser lytischen Infektion der Zellen sollte zum Vergleich eine abortive Infektion erfolgen, die mit einem anderen Virus der Herpesgruppe, dem Epstein-Barr Virus, durchgeführt wurde.

Diese Untersuchungen sollen klären, ob eine Infektion mit DNS-Viren grundsätzlich mit einer Stimulierung der mitochondrialen DNS-Synthese verbunden ist, oder lediglich im Falle einer lytischen Infektion auftritt. Eine selektive Stimulierung der mitochondrialen DNS-Synthese in abortiv infizierten Zellen könnte sich als ein Parameter für die Transformationsfähigkeit eines Virus herausstellen.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. Zellkulturen

2.1.1. Raji-Zellen: Bei diesen handelt es sich um eine lymphoblastoide Zelllinie, die ursprünglich aus einem Burkitt-Tumor isoliert wurde (4). Ein Merkmal dieser Zellen besteht darin, daß sie als Suspensionskultur gezüchtet werden können. Ihre Kultivierung erfolgte durch Zusatz von 4 Teilen RPMI 1640 Medium mit 10% Kalbsserum und 50 µg Chlortetrazyklin/ml einmal wöchentlich. Das RPMI 1640 Medium wurde von den Biocult Laboratories in handelsüblicher Form bezogen (Erstbeschreiber: MOORE, 1967). Da Raji-Zellen kein EBV produzieren, bezeichnet man sie als eine Non-Producer-Zelllinie (13).

2.1.2. HR-1K-Zellen: Auch diese Zelllinie stammt ursprünglich von einem Burkitt-Tumor ab (13). Im Gegensatz zur Raji-Zelllinie können jedoch 1-10% dieser Zellen, je nach Kulturbedingungen, EBV produzieren (Producer-Zelllinie).

Beide Zelllinien wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. H. ZUR HAUSEN, Institut für Klinische Virologie der Universität Erlangen, zur Verfügung gestellt.

### 2.2. Virus

2.2.1. HSV: Der verwendete Stamm (Typ 1) war ursprünglich in unserem Institut isoliert worden. Für die beabsichtigten Experimente wurde ein Virusvorrat aus drei Roux-Flaschen, die mit primären Kaninchennierenzellen beschickt waren, wie folgt hergestellt: Die Kaninchennierenzellen wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. KOHLHAGE, Hygiene-Institut der Universität Marburg,

überlassen. Die Kulturen wurden mit je 5 ml einer HSV-Suspension für eine Stunde bei 37°C beschickt ( $6 \cdot 10^6$  PFU/ml), dann dreimal mit Phosphatpuffer gewaschen und mit serumlosem Eagles Basal Medium, das 50 µg/ml Chlortetracyclin enthielt, versehen. Sobald -nach 48 bis 72 Stunden- der virustypische cytopathische Effekt vollständig ausgebildet war, wurde das Kulturmedium abgesaugt und bei 4°C aufbewahrt. Die infizierten Zellen selbst wurden einem dreimaligen Gefrier- und Tauprozess in Aceton/Trockeneis unterworfen und anschließend bei 4000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand ist sodann mit dem Kulturmedium vereinigt und durch ein Millipore-Filter (Porengröße 0,45 µm) filtriert worden, um Zelltrümmer zu entfernen. Das Filtrat wurde dann in 5 ml Portionen in Glasampullen abgefüllt und bei -80°C aufbewahrt.

In einigen Fällen wurde das Filtrat zur Konzentrierung des Virus 1 Stunde bei 20000 g zentrifugiert und in einem zehnmal kleinerem Volumen resuspendiert, wodurch eine Steigerung des Virustiters um den Faktor 5 erreicht wurde.

2.2.2. Titration von HSV: Die Titration erfolgte ebenfalls auf primären Kaninchennierenzellen und wurde in 1 ml Zellkulturröhrchen durchgeführt. Zunächst wurde die Vorrats-Virussuspension bis zu einer Endverdünnung von  $10^{-10}$  PFU/ml mit serumfreiem Kulturmedium verdünnt. Je 4 mit serumfreiem Medium beschickte Zellkulturröhrchen erhielten sodann jeweils 0,2 ml jeder Virusverdünnungsstufe. Nach 24, 48 und 72 Stunden p.i. bis 37°C wurde der cytopathische Effekt kontrolliert. Als Virustiter der Vorratssuspension galt die höchste

Verdünnungsstufe, in der noch 2 von 4 Röhrchen einen herpestypischen cytopathischen Effekt aufwiesen.

2.2.3. EBV: Das Ausgangsmaterial für seine Isolierung war die Producer-Zelllinie HR-1K. Diese Zellen produzieren ständig Virus, das aus den Kulturüberständen gewonnen werden kann. Auch in diesem Falle wurde das Kulturmedium nach Abzentrifugieren der Zellen abgesaugt und bei 4°C aufbewahrt. Das Zellsediment wurde sodann in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und nach dreimaligem Gefrier- und Tauprozess bei 4000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem Kulturmedium vereint, durch ein Milliporefilter (Porengröße 0,45 µm) filtriert, in 5 ml Portionen abgefüllt und bei -80°C aufbewahrt. Vor der Filtration war noch eine Zentrifugation bei 20000 g für eine Stunde durchgeführt worden; 9/10 des Überstandes wurde abgesaugt, und der Niederschlag in dem verbliebenen 1/10 zur folgenden Filtration resuspendiert.

Da zum Zeitpunkt unserer Versuche keine exakte Titrationmethode zur Verfügung stand, wurde die Viruskonzentration der Suspension grob durch indirekte Immunfluoreszenz geschätzt.

## 2.3. Infektion von Raji-Zellen

2.3.1. mit HSV: 10<sup>8</sup> Raji-Zellen wurden in 5 ml serumfreiem RPMI 1640 Medium suspendiert, mit HSV in einer Multiplizität von 1-3/Zelle infiziert und nach guter Vermischung 2 Stunden bei 37°C inkubiert, wobei die Suspension in Abständen von 10 Minuten aufgeschüttelt wurde. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen niedertourig abzentrifugiert, in serumlosem RPMI 1640 zu einer Dichte von 5·10<sup>5</sup> Zel-

len/ml resuspendiert und gleichmäßig in 4 bis 6 Portionen für die radioaktive Markierung der einzelnen Pulse verteilt. Schließlich erfolgte die Virustitration der Überstände auf Kaninchennierenzellen.

2.3.2. mit EBV: In 5 ml der Virussuspension wurden  $10^8$  Raji-Zellen aufgeschwemmt und wie bei der Infektion mit HSV 2 Stunden lang bis  $37^{\circ}\text{C}$  unter 10-minütigem Aufschütteln inkubiert, abzentrifugiert, in serumfreiem RPMI 1640 Medium zu einer Dichte von  $5 \cdot 10^5$  Zellen/ml resuspendiert und in 3 bis 6 gleichmäßige Portionen verteilt.

#### 2.4. Immunfluoreszenz

2.4.1. mit HSV-infizierten Zellen: Der Nachweis des HSV-Antigens erfolgte in Anlehnung an die von HENLE et al. (8) angegebene Methode durch indirekte Immunfluoreszenz. 1 ml aus der infizierten Zellsuspension wurde nach dem Waschen in phosphatgepufferter NaCl (pH 7,4) auf einen Objektträger aufgetragen, bei Zimmertemperatur luftgetrocknet und anschließend in Aceton 10 Minuten fixiert. Dann wurden die Zellen mit Anti-HSV-Serum vom Kaninchen überschichtet und in einer feuchten Kammer im Brutschrank bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach 45 min wurden die Präparate fünfmal in 0,9% NaCl gründlich gewaschen, mit Anti-Kaninchenserum vom Schwein, das mit dem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt war, überschichtet und 45 min im Brutschrank in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach nochmaligem fünfmaligem Waschen in 0,9% NaCl konnten die Präparate unter dem UV-Mikroskop ausgewertet werden.

Die Immunseren wurden uns dankenswerterweise von

Prof. Dr. W. SLENCZKA, Hygiene-Institut Marburg zur Verfügung gestellt.

2.4.2. mit EBV-infizierte Zellen: Der indirekte Immunfluoreszenztest zum Nachweis von Early Antigen (EA) erfolgte nach HENLE et al. (8). Es handelt sich im Prinzip um die gleiche Methode wie zum Nachweis des HSV-Antigen. Als EA-positives Serum wurde das Serum eines an Burkitt-Tumor erkrankten Patienten verwandt, das uns freundlicherweise Prof. Dr. H. ZUR HAUSEN, Institut für Klinische Virologie der Universität Erlangen, zur Verfügung gestellt hat. Das mit dem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte Anti-Human-Serum stammte vom Kaninchen und wurde uns von Prof. Dr. SLENCZKA, Hygiene-Institut der Universität Marburg, überlassen.

Die Infektion von Raji-Zellen mit der verwendeten EBV-Suspension von HR-1K-Zellen führte zu 26 bis 33% EA-positiver Zellen.

## 2.5. Darstellung von nukleärer und mitochondrialer DNS im Dichtegradienten

Nukleäre und mitochondriale DNS wurden aus demselben Zellmaterial isoliert. Die Trennung erfolgte in einem ersten Schritt nach der Methode von HIRT (10), die zu einem Sediment führt, das die hochmolekulare nukleäre DNS, sowie im Überstand die niedermolekulare mitochondriale DNS und Fragmente nukleärer DNS enthält.

Die Zellen wurden am Ende eines Pulses mit Phosphatpuffer (pH 7,4) gewaschen, bei 800 g abzentrifugiert, in 1 ml (pH 7,4) Puffer aus 0,01 M Tris-HCl und 0,001 M Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA) aufgenommen und in einer Plastikpetrischale verteilt.

Die Zellyse erfolgte durch Zugabe einer Lösung, bestehend aus 1 ml 2% Sodiumdodecylsulfat (SDS) und 0,5% Pronase, bei Zimmertemperatur für mindestens 12 Stunden. Das klar-visköse Lysat wurde sehr vorsichtig, ohne zu pipettieren, in ein Plastikzentrifugenröhrchen überführt, durch Zusatz von 7 M Caesiumchlorid (CsCl) auf eine Endkonzentration von 1 M eingestellt und mindestens 8 Stunden verschlossen bei 4°C aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen wird die hochmolekulare DNS mit einem Molekulargewicht von mehr als  $10^7$  Dalton gefällt, während die niedermolekulare DNS in Lösung bleibt.

2.5.1. Nukleäre und virale DNS: Das HIRT-PELLET wurde in 2 ml Tris-EDTA (pH 7,4) aufgenommen und davon 0,5 ml weiterverarbeitet. Hierzu wurden 2 ml aus der mit 0,1 x SSC (Sodium chloride 0,15 M NaCl, Sodium citrate 0,015 M Natriumcitrat gesättigten Phenolphase eines Phenol/SSC Puffers (pH 9) zugegeben und bei Kälte 20 min gut geschüttelt. Dann wurde nach Zentrifugieren (1000 g, 15 min, 4°C) die obere wässrige Phase abgezogen und erneut mit 2 ml Phenol/SSC Puffer (pH 9) bei Kälte geschüttelt, während die untere Phase verworfen wurde. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt, dann die wässrige Phase mit der 2,5-fachen Menge reinen, kalten Alkohols gut vermischt und mindestens 8 Stunden lang bei -20°C gefällt. Durch Zentrifugieren (1000 g, 30 min, 4°C) wurde ein weißer Niederschlag, bestehend aus DNS und RNS, gewonnen, der nach dekantieren des Überstandes in 2 ml 0,1 x SSC gelöst wurde. Dazu kam ein Tropfen Ribonuklease (RNase) aus einer Stammlösung, die durch Lösen von 10 mg RNase in 5 ml destilliertem Wasser und anschließendem 5-minütigem Kochen hergestellt worden war. Die RNasebehandlung wurde eine Stunde bei 37°C durchgeführt.

Dann erfolgten erneute Fällung mit kaltem, reinem Alkohol, Zentrifugation (1000 g; 30 min; 4°C) und Dekantieren des Überstandes, während der Niederschlag mit 0,5 ml 2 x SSC gelöst und mit 7 M CsCl auf eine Dichte von 1,7 g/cm<sup>3</sup> bei Zimmertemperatur für die Dichte-Zentrifugation zur Trennung der Kern- und Virus-DNS eingestellt wurde. Diese Lösung wurde mit Paraffinöl überschichtet und 48 Std. bei 100000 g und 20°C im T65-Rotor einer Beckman Zentrifuge zentrifugiert. Zur Auswertung des Gradienten wurden Fraktionen von je 2 Tropfen durch Einstechen einer feinen Nadel aus dem Zentrifugenröhrchen entnommen.

Jede Fraktion ist nach der Dichtebestimmung mit 2,9 ml 0,1 x SSC-Lösung (ph 9) aufgefüllt worden. Davon wurden 0,5 ml zur Fällung mit Trichloressigsäure (TCE) auf je einen Membranfilter für die Bestimmung der Radioaktivität aufgetragen. Mit dem Rest jeder Fraktion wurde der Gehalt an DNS photometrisch bei 260 nm bestimmt. Dabei entsprach die Extinktion von 1,0 einem DNS-Gehalt von 50 µg/ml unter Verwendung von 1 cm<sup>3</sup>-Küvetten (10). Die spezifische Radioaktivität wurde unter Berücksichtigung der verwendeten Dosis nach der Formel: spez. Akt. = 2·cpm / E (260 nm) · 50 µg DNS berechnet.

Die Fällung mit TCE wurde folgendermaßen durchgeführt: Nach Zusatz von je 1 Tropfen gelöster Hefe-RNS wurden die säureunlöslichen Bestandteile mit je 1 ml 10% TCE bei 0°C gefällt, und die einzelnen Fraktionen durch Ausspülen mit kalter 5% TCE aus den Reagenzgläsern auf je ein Membranfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm aufgetragen. Die Filter wurden in je ein Zählröhrchen übertragen, getrocknet und mit 5 ml Toluol, das einen Zusatz von 0,5 g 1,4-Bis(2-(5-phenyloxazolyl))-benzol (PoPoP) und 4g 2,5-Diphenyloxazol (PPo) pro Li-

ter enthielt, überschichtet. Die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen wurde in einem Szintillationszähler der Firma Nuclear Chicago gemessen.

2.5.2. Mitochondriale DNS: Für die Charakterisierung der mitochondrialen DNS durch Dichtegradientenzentrifugation wurden die durch die HIRT-Methode gewonnenen Überstände einer CsCl-Ethidiumbromid-Zentrifugation unterworfen. Das Ausgangsmaterial wurde mit einer 7 M Lösung von CsCl, die 100 µg/ml Ethidiumbromid enthielt, auf eine Dichte von 1,57 g/cm<sup>3</sup> eingestellt und anschließend in einem T65 Festwinkelrotor zentrifugiert (100000 g; 24 Std.; 20°C). Durch Anstechen des Bodens des Zentrifugenröhrchens konnten Fraktionen zu je 6 Tropfen gewonnen werden. Die Auswertung der Radioaktivität erfolgte nach den gleichen Methoden wie bei nukleärer DNS.

## 2.6. Bestimmung der Dichte in CsCl-Gradienten

Dichtebestimmungen von CsCl-Lösungen vor Beginn der Dichtegradientenzentrifugation und der einzelnen Fraktionen der CsCl-Gradienten erfolgten mit Hilfe eines Refraktometers nach ABBÉ. An Hand von Tabellen wurde der bestimmte Refraktationsindex in Dichte (g/cm<sup>3</sup>) umgerechnet.

## 2.7. Bestimmung der säurelöslichen Radioaktivität

Am Ende eines Pulses mit <sup>3</sup>H-Thymidin wurden 2 ml der virusinfizierten Raji-Zellsuspension entnommen, bei 800 g zentrifugiert, und die Zellen dreimal in Phosphatpuffer gewaschen, um noch anhaftendes <sup>3</sup>H-Thymidin zu entfernen. Anschließend wurde das Zellsediment in 5 ml 10% TCA resuspendiert und 60 min bei 4°C gefällt. Dann wurde bei

300 g abzentrifugiert. 5 ml des Überstandes dienten zur Messung der säurelöslichen Radioaktivität, die in 10 ml Scintigel-Roth im Szintillationszähler durchgeführt wurde.

## 2.8. Bestimmung der Zellzahl

Zellzahlen wurden in einer Zählkammer nach THOMA bestimmt, wobei tote Zellen mit der Ausschlußmethode nach Anfärben mit Trypanblau abgezogen wurden.

## 2.9. Proteinbestimmungen

Da in verschiedenen Experimenten die Radioaktivität auf Zellprotein bezogen wurde, mußten Bestimmungen der Proteinmenge durchgeführt werden. Hierzu diente die Standardmethode nach LOWRY (16).

## 2.10. Versuchsanordnung

Eine geeignete Methode zur Untersuchung der Kinetik biosynthetischer Aktivitäten ist das Pulsexperiment. Hierbei wird für einen definierten Zeitraum ein radioaktiv markierter Vorläufer, der für die Synthese der zu untersuchenden makromolekularen Substanz gebraucht wird, den Zellen angeboten. Da in den zu beschreibenden Experimenten die Kinetik der DNS-Synthese unter den Bedingungen einer Virusinfektion untersucht werden sollte, wurde  $^3\text{H}$ -Thymidin als DNS-Vorläufer verwendet.

In einem typischen Experiment wurden  $10^8$  Raji-Zellen mit HSV oder EBV, wie vorstehend angegeben, infiziert. Im Anschluß an die Infektion sind die Zellen in serumfreiem Medium in einer Konzentration von  $5 \cdot 10^5$  Zellen/ml resuspendiert und auf 3 bis 6 Kulturflaschen, je nach Experiment, verteilt worden. Als Kontrollen dienten schein-

infizierte, jedoch sonst identisch behandelte Raji-Zellen. Die Scheininfection wurde mit gebrauchtem Kulturmedium von Raji-Zellen durchgeführt, das an Stelle der Virussuspension den Zellen zugesetzt wurde. Kein wesentlicher Unterschied ergab sich, ob man Kontrollwerte zu jedem einzelnen Pulsintervall bestimmte, oder nur eine Kontrolle zu einem beliebigen Pulsintervall mit ansetzte.

Als Pulsdauer wurde ein Zeitraum von 12 Stunden festgelegt. Die technische Durchführung erfolgte durch Zusatz von  $^3\text{H}$ -Thymidin zu einer Kulturflasche, sodaß eine Endkonzentration von 1 bis 2  $\mu\text{Ci/ml}$  erreicht wurde. Mit 6 angesetzten Zellkulturen konnte somit ein Zeitraum von 74 Stunden erfaßt werden, der sich aus zweistündiger Virusadsorption und 6 Pulsen von je 12 Stunden Dauer (2-14; 14-26; 26-38; 38-50; 50-62; 62-74 Std. p.i.) zusammensetzte. Im Anschluß an den Puls mit radioaktivem Thymidin wurden die Zellen sedimentiert und mit Hilfe der von HIRT angegebenen Methode auf Anteile ihrer niedermolekularen und hochmolekularen radioaktiven DNS untersucht. Die Charakterisierung der hochmolekularen DNS erfolgte durch CsCl-Zentrifugation, die der niedermolekularen DNS (mitochondriale DNS enthaltend) durch CsCl-Ethidiumbromid-Zentrifugation. Diese Methode kann zur Darstellung der verschiedenen DNS-Arten in virusinfizierten Zellen angewandt werden, weil sich virale und zelluläre DNS aufgrund des hohen Guanin-Cytosin-Gehaltes der HSV-DNS deutlich unterscheiden. (Fig. 1) Weiterhin läßt sich ringförmige mitochondriale DNS durch CsCl-Ethidiumbromid-Zentrifugation von anderen zellulären und viralen DNS-Arten abtrennen.

Die Radioaktivität in der jeweils typischen Position im Gradienten wurde als repräsentativ für die Synthese-

rate der entsprechenden DNS angesehen. In einigen Fällen wurde zusätzlich noch die spezifische Aktivität der DNS (= Radioaktivität in cpm/ $\mu$ g DNS) bestimmt.  
(cpm = Counts per minute)

### 3. ERGEBNISSE

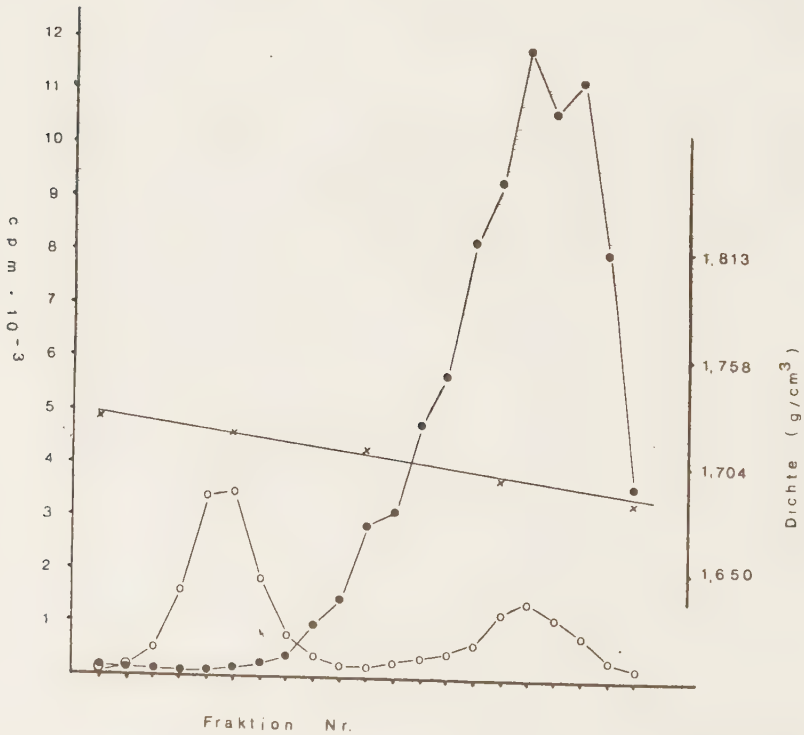
#### 3.1. Untersuchungen zur zelleigenen DNS-Synthese in mit HSV infizierten Raji-Zellen

Wie vorstehend beschrieben, wurden  $10^8$  Raji-Zellen mit HSV in einer Multiplizität von ca. 1 infiziert. Diese Virusdosis führte zu einer Infektion von 50-60% der Zellen, wie mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz ermittelt wurde.

**3.1.1. Kern-DNS-Synthese:** Der durch die HIRT-Methode gewonnene Niederschlag wurde, wie in 2.5. beschrieben, behandelt. Die Daten dieses experimentellen Ansatzes geben Tabelle 1 und Figur 2 wieder. Es zeigt sich die erwartete Hemmung der DNS-Synthese im Kern nach HSV-Infektion im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle. Während in der Phase von 2-14 Std. p.i. eine 13%ige Hemmung zu beobachten war, wurden im Pulsintervall von 50-62 Std. p.i. nur noch 2% der in die Kontrolle eingebauten Radioaktivität in die nukleäre DNS virusinfizierter Zellen inkorporiert. Diese Hemmung ist bereits, wie aus den beiden in Tabelle 1 dargestellten Experimenten hervorgeht, vor Auftreten von infektiösem Tochtervirus deutlich.

**3.1.2. Mitochondriale DNS-Synthese:** Im Gegensatz zur Hemmung der Kern-DNS-Synthese im Intervall 2-14 Std. p.i. wurde die mitochondriale DNS-Synthese über den normalen Wert hinaus stimuliert. In den späteren Phasen war jedoch auch der Einbau radioaktiv markierter Vorläufer in die mitochondriale DNS zunehmend gehemmt (Tabelle 1). Die Stimulierung der mitochondrialen DNS-Synthese beschränkt sich offensichtlich auf den Zeitraum vor dem Auftreten infektiöser Virusnachkommenschaft (Tabelle 1; Abbildung 2).

Abbildung 1: Isopyknische Zentrifugation von hochmolekularer DNS aus nicht infizierten und mit HSV infizierten Raji-Zellen. Nach Pulsmarkierung für 12 Stunden mit  $^3\text{H}$ -Thymidin wurde die hochmolekulare DNS aufbereitet. Die säurefällbare Radioaktivität nach Fraktionierung des Gradienten ist in der Figur dargestellt.



nicht infizierte Raji-Zellen (---)  
mit HSV infizierte Raji-Zellen (o-o)  
Dichte (x-x)

Tabelle 1: Zelluläre DNS-Synthese und Virusvermehrung in  
mit HSV infizierten Raji-Zellen

| Markierungszeit<br>der Pulse nach<br>Infektion (Std.) | Zelluläre DNS                                |                                   | Konzentra-<br>tion infek-<br>tiösen Virus<br>(TCID <sub>50</sub> /ml) |
|-------------------------------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
|                                                       | mitochondri-<br>alen Ursprungs <sup>a)</sup> | aus dem<br>Zellkern <sup>b)</sup> |                                                                       |
| Experiment H1                                         |                                              |                                   |                                                                       |
| 2-14                                                  | 1,80                                         | 0,88                              | 5·10 <sup>2</sup>                                                     |
| 14-26                                                 | 1,30                                         | 0,47                              | 5·10 <sup>2</sup>                                                     |
| 26-38                                                 | 0,52                                         | 0,14                              | 5·10 <sup>3</sup>                                                     |
| 38-50                                                 | 0,18                                         | 0,10                              | 2,5·10 <sup>4</sup>                                                   |
| 50-62                                                 | 0,16                                         | 0,02                              | 5·10 <sup>4</sup>                                                     |
| 62-74                                                 | 0,11                                         | -                                 | 2,5·10 <sup>5</sup>                                                   |

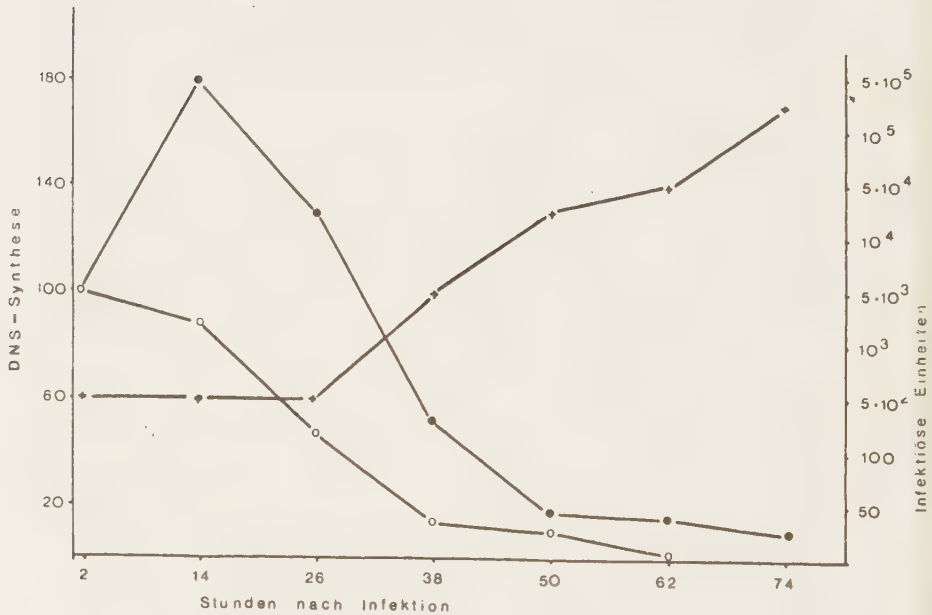
Experiment H2

|       |      |      |                  |
|-------|------|------|------------------|
| 2-14  | 1,45 | 0,53 | $2,5 \cdot 10^2$ |
| 14-26 | 0,40 | 0,15 | $5 \cdot 10^3$   |
| 26-38 | 0,08 | 0,10 | $2,5 \cdot 10^4$ |
| 38-50 | 0,03 | -    | $5 \cdot 10^4$   |

a) Quotient aus der Menge an Radioaktivität (cpm) in der für mitochondriale DNS typischen Position in infizierten und scheininfizierten Zellen. 1 entspricht einem Durchschnittswert von 2830 cpm.

b) Quotient aus spezifischer Aktivität von DNS in der Position für nukleäre DNS infizierten und scheininfizierten Zellen. 1 entspricht einem Durchschnittswert von 2060 cpm/ $\mu$ g DNS.

Abbildung 2: Kinetik der nukleären und mitochondrialen DNS-Synthese sowie der Virusvermehrung in mit HSV infizierten Raji-Zellen.



100% = die in scheininfizierten Zellen bestimmte DNS-Synthese.

•-• mitochondriale DNS-Synthese ( Radioaktivität von mitochondrialer DNS in HSV infizierten Zellen  $\cdot$  100 / Radioaktivität mitochondrialer DNS in scheininfizierten Zellen)

o-o Kern-DNS-Synthese (spezifische Aktivität in HSV infizierten Zellen  $\cdot$  100 / spezifische Aktivität in scheininfizierten Zellen)

x-x Konzentration infektiöser Viren

### 3.2. Untersuchungen zur zelleigenen DNS-Synthese in mit EBV infizierten Raji-Zellen

In identischer Versuchsanordnung wurden Raji-Zellen mit EBV infiziert, wonach 26 bis 33% der Zellen mit der indirekten Immunfluoreszenz nachweisbares Early Antigen bildeten.

3.2.1. Kern-DNS-Synthese: Der durch die HIRT-Methode gewonnene Niederschlag wurde, wie in 2.5. beschrieben, aufbereitet. Die Resultate von zwei Experimenten sind in Tabelle 2 und Abbildung 3 wiedergegeben. Es ist daraus ersichtlich, daß die abortive EBV-Infektion zu einer progressiven Hemmung der Kern-DNS-Synthese führte. Im ersten Pulsintervall fand eine 32%-ige bzw. 9%-ige Hemmung statt. Nach 38 Std. p.i. betrug die nukleäre DNS-Synthese in infizierten Zellen, im Vergleich zur Kontrolle, nur noch 47%. Die unterschiedliche Hemmung der nukleären DNS-Synthese ist wahrscheinlich auf eine verschiedene Multiplizität bei der Infektion zurückzuführen. Sie dürfte präparationsbedingt bei der EBV-Isolierung sein, da zur Zeit der Versuche noch keine zuverlässige Titrationsmethode bekannt war. Aus technischen Gründen war es nicht möglich, alle Infektionen mit dem gleichen Viruspool durchzuführen.

Bei der Auswertung der CsCl-Gradienten fand sich keine Anreicherung der Radioaktivität in der für EBV typischen Position.

3.2.2. Mitochondriale DNS-Synthese: Parallel zur Kern-DNS-Synthese der mit EBV infizierten Raji-Zellen war eine Hemmung der DNS-Synthese in den Mitochondrien von ca. 30% schon im Pulsintervall von 2 bis 14 Std. p.i. im Vergleich zur scheininfizierten Kontrolle vorhan-

von (Tabelle 2; Abbildung 3). Im weiteren Verlauf der Infektion nahm die Hemmung der mitochondrialen DNS-Synthese weiter zu. Spätere Phasen wurden bei der EBV-Infektion nicht untersucht, da eine Änderung der bereits deutlichen Tendenz nicht zu erwarten war.

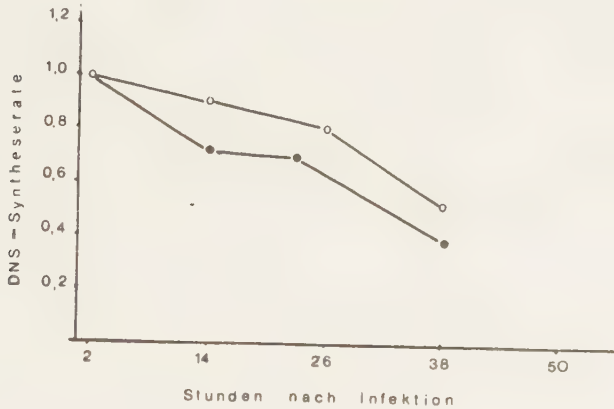
Tabelle 2: Zelluläre DNS-Synthese in mit EBV infizierten Raji-Zellen

| Markierungszeit<br>der Pulse p.i.<br>(Stunden) | Zelluläre DNS                    |                        |
|------------------------------------------------|----------------------------------|------------------------|
|                                                | mitochondrialen<br>Ursprunges a) | aus dem<br>Zellkern b) |
| Experiment E1                                  |                                  |                        |
| 2-14                                           | 0,72                             | 0,68                   |
| 14-26                                          | 0,61                             | -                      |
| 26-38                                          | 0,50                             | -                      |
| 38-50                                          | 0,44                             | -                      |
| Experiment E2                                  |                                  |                        |
| 2-14                                           | 0,73                             | 0,91                   |
| 14-26                                          | 0,70                             | 0,82                   |
| 26-38                                          | 0,40                             | 0,53                   |

a) Quotient aus Radioaktivität in der für mitochondriale DNS typischen Position in mit EBV infizierten und scheininfizierten Zellen. 1 entspricht durchschnittlich 2020 cpm/ $\mu$ g DNS.

b) Quotient aus spezifischer Aktivität nukleärer DNS in mit EBV infizierten und scheininfizierten Zellen. 1 entspricht durchschnittlich 2270 cpm/ $\mu$ g DNS.

Abbildung 3: Nukleäre und mitochondriale DNS-Synthese  
in mit EBV infizierten Raji-Zellen



•-• mitochondriale DNS-Synthese (Quotient aus Radioaktivität von mitochondrialer DNS in mit EBV infizierten Zellen / Radioaktivität mitochondrialer DNS in scheininfizierten Zellen)

o-o Kern-DNS-Synthese (Quotient aus spezifischer Aktivität in mit EBV infizierten Zellen / spezifische Aktivität in scheininfizierten Zellen)

### 3.3. Untersuchungen zur zellgebundenen säurelöslichen Radioaktivität in mit HSV bzw. EBV infizierten Zellen

Die Messung der säurelöslichen Radioaktivität wurde am Ende jedes Pulses durchgeführt, wie in 2.7. beschrieben. In Tabelle 3 sind die Ergebnisse als Durchschnittswerte von 3 Experimenten aufgeführt. Es zeigte sich, daß die Infektion mit HSV in den Raji-Zellen eine deutliche Steigerung des säurelöslichen, phosphorylierten  $^3\text{H}$ -Thymidin bewirkte, während die EBV-Infektion keine eindeutige Veränderung nach sich zog.

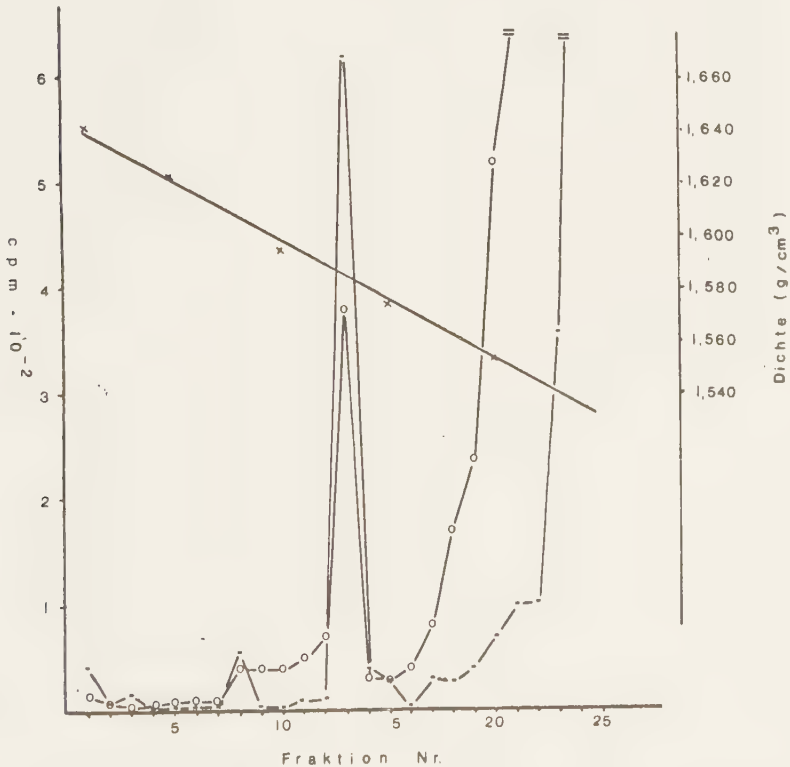
Tabelle 3: Säurelösliche Radioaktivität in mit HSV bzw. EBV infizierten Raji-Zellen

| Markierungszeit<br>der Pulse p.i.<br>(Stunden) | Säurelösliche Radioaktivität <sup>a)</sup> in mit |                                              |
|------------------------------------------------|---------------------------------------------------|----------------------------------------------|
|                                                | HSV infizierten <sup>b)</sup><br>Raji-Zellen      | EBV infizierten <sup>b)</sup><br>Raji-Zellen |
| 2-14                                           | 5,1                                               | 0,9                                          |
| 14-26                                          | 21,6                                              | 1,1                                          |
| 26-38                                          | 51,6                                              | 2,0                                          |
| 38-50                                          | 31,9                                              | 1,4                                          |

a) Quotient aus säurelöslicher Radioaktivität in cpm je 100  $\mu\text{g}$  virusinfizierter Zellen / säurelösliche Radioaktivität in cpm je 100  $\mu\text{g}$  scheininfizierter Zellen

b) Durchschnittswerte von 3 Experimenten

Abbildung 4: Graphische Darstellung des CsCl-Äthidiumbromidgradienten im Experiment E2. Die Radioaktivität ist in der Position für mitochondriale DNS (14 Std. p.i.) aufgetragen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde nur der untere Teil des Gradienten bis zum Auftreten der Kern-DNS dargestellt.



Nach Pulsmarkierung und entsprechender Aufbereitung wurde die niedermolekulare DNS für 24 Std. bei 100 000 g und  $20^\circ\text{C}$  in einem T65 Festwinkelrotor zentrifugiert. Die Abbildung zeigt die säurefällbare Radioaktivität nach Fraktionierung.

--- Scheininfection

o-o Infektion mit EBV

x-x Dichte

#### 4. DISKUSSION

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, daß die Infektion von permanenten menschlichen Lymphoblasten mit HSV (Typ 1), ebenso wie in HeLa-Zellen (11) die mitochondriale DNS stimuliert. Diese Aktivierung beschränkt sich jedoch nur auf den Zeitraum vor Auftreten der infektiösen Virusnachkommenschaft. Die nukleäre DNS-Synthese wurde unter diesen Bedingungen zunehmend gehemmt, ein Befund, der bei der HSV-Infektion wiederholt beschrieben wurde (11; 22).

Im Gegensatz dazu war nach abortiver Infektion der gleichen Zellart mit EBV eine progressive Hemmung sowohl der Mitochondrien- als auch der Kern-DNS-Synthese zu beobachten.

Vor Interpretation dieser Ergebnisse müssen zunächst die schon vorliegenden Untersuchungen an Zellkulturen nach Infektion mit Polyoma- bzw. SV 40-Virus in Betracht gezogen werden. Beide Viren führen bei permissiven Zellkulturen nach LEVINE (15) bzw. VESCO et al. (25) zu einer Induktion der mitochondrialen DNS-Synthese. Sie verläuft mit der nukleären DNS-Synthese gleichsinnig. Dieses letztere Verhalten wird als charakteristisches Zeichen zellulärer Infektion mit DNS-Tumoviren angesehen, die unter bestimmten Umständen zu einer neoplastischen Transformation führen kann (21). In diesem Sinne muß auch die Induktion der zellulären DNS-Synthese von Nabelschnurlymphozyten nach Infektion mit EBV interpretiert werden (5).

Unsere Resultate schließen eine Induktion der nukleären DNS-Synthese permanenter Lymphoblastenkulturen sowohl durch HSV als auch durch EBV aus. Die beobachtete Hemmung auch nach EBV-Infektion steht in Einklang mit

den Ergebnissen von GERBER (5) und GERGELY et al. (6). Bei dem verwendeten Raji-System handelt es sich um Zellen, die bereits mit EBV transformiert sind und deshalb nur für eine abortive Superinfektion mit homologem Virus empfänglich sind (9).

Die Stimulierung der mitochondrialen DNS-Synthese durch HSV in Raji-Zellen stellt ein interessantes Phänomen dar, das allerdings wohl nicht im Rahmen einer Transformation von Raji-Zellen mit HSV (Zellkulturen können grundsätzlich durch mehr als einen Virus transformiert werden (10)) diskutiert werden kann. Es erscheint unwahrscheinlich, daß eine Transformation bei progressiv gehemmter nukleozytoplasmatischer Aktivität über die Mitochondrien stattfinden kann (24). Das Phänomen muß vielmehr als Ausdruck einer zellulären Reaktion auf die Virusinfektion gesehen werden, deren Analyse eventuell Aufschluß über die zelluläre Kontrolle der mitochondrialen DNS-Synthese geben kann. Der von uns in mit HSV infizierten Zellen festgestellte erhöhte Einbau von DNS-Vorläufern in Mitochondrien-DNS kann theoretisch grundsätzlich auf folgenden Ursachen beruhen:

- 1) Induktion der mitochondrialen DNS-Polymerase
- 2) Vermehrtes Angebot von DNS-Vorläufern durch Nukleotidpoolveränderungen
- 3) Anregung der mitochondrialen DNS-Synthese durch virusinduzierte Enzyme.

Eine Induktion der Mitochondrien-eigenen DNS-Polymerase, die im Zytoplasma synthetisiert wird, erscheint unwahrscheinlich, weil die "viralen Inhibitoren" (11) zu einer progressiven Abschaltung zelleigener zytoplasmatischer Proteinsynthese führen. Die Beteiligung virusinduzierter Enzyme, z.B. der virusinduzierten DNS-Polymerase,

an dem beobachteten Phänomen konnte kürzlich ausgeschlossen werden (26). In Zellkulturansätzen hatte sich nämlich gezeigt, daß unter Bedingungen, die eine maximale Aktivität der viralen DNS-Polymerase begünstigten, keine Erhöhung der mitochondrialen DNS-Syntheserate eintrat.

Am wahrscheinlichsten erscheint deswegen die Annahme, daß virusinduzierte Nukleotidpool-Veränderungen die beobachtete Stimulierung der mitochondrialen DNS-Synthese nach HSV-Infektion verursachen. In Einklang mit dieser Hypothese steht die Beobachtung, daß EBV eine derartige Reaktion nicht bewirkt. Im Gegensatz zu EBV induziert HSV eine Thymidinkinaseaktivität in infizierten Zellen, was zu einer erheblichen Zunahme von phosphorylierten Nukleotiden in der Zelle führt (3). Wird nun exogen radioaktives Thymidin angeboten, so erscheint im Gefolge der HSV-Infektion, wie wir zeigen konnten, ca. 50-mal mehr Radioaktivität in Form von phosphoryliertem  $^3\text{H}$ -Thymidin in infizierten Zellen als in nicht infizierten Kontrollen. Da der zytoplasmatische Nukleotidpool in Korrelation mit dem mitochondrialen steht, muß sich dieses Überangebot an radioaktiven DNS-Vorläufern auch auf den Einbau in die mitochondriale DNS auswirken. Der Befund, daß die Kern-DNS-Synthese des gleichen Zellstammes nicht in entsprechender Weise reagiert, ist mit großer Sicherheit in der Hemmwirkung der virusinduzierten Inhibitoren auf die Kern-DNS-Synthese zu suchen.

Stellt man diese Befunde denen der mitochondrialen DNS-Synthese in EBV-infizierten Zellen gegenüber, in denen offensichtlich auch virale Inhibitoren wirksam sind, muß man annehmen, daß deren Wirkung auf die mitochondriale DNS-Synthese in HSV-infizierten Zellen wäh-

rend des frühen Stadiums der Infektion durch eine höhere spezifische Aktivität der radioaktiven DNS-Vorläufer im mitochondrieneigenen Nukleotidpool zunächst überkompensiert wird und als "Stimulierung" erscheint. Daß eine gleichartige Reaktion nicht auch für die zelleigene, nukleäre DNS-Synthese zutrifft, liegt möglicherweise daran, daß der nukleo-zytoplasmatische Nukleotidpool in erster Linie für die virale DNS-Synthese beansprucht wird.

Aus den vorliegenden Ergebnissen läßt sich deshalb im Zusammenhang mit früheren Befunden kein Hinweis darauf ableiten, daß Mitochondrien in den untersuchten Systemen für die Virusvermehrung oder virusinduzierte Transformation bei DNS-Viren eine Rolle spielen. Die partielle Autonomie des Chondrioms wird durch unsere Untersuchungen jedoch erneut unterstrichen.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

An Raji-Zellen wurden durch Infektion mit zwei DNS-Viren, dem Herpes-Simplex Virus (HSV) und dem Epstein-Barr Virus (EBV) vergleichende Untersuchungen über die Synthese von DNS in den Mitochondrien und im Zellkern durchgeführt.

Es fand sich in den HSV-infizierten Zellen ein Anstieg der mitochondrialen DNS-Synthese zu Beginn der Infektion. In den EBV-infizierten Zellen wurde hingegen von Anfang der Infektion an eine zunehmende Hemmung der DNS-Synthese in den Mitochondrien beobachtet. Bei der Bestimmung der DNS-Synthese im Zellkern wurde bei beiden Viren eine zunehmende Hemmung festgestellt.

Die nachgewiesene Stimulierung der mitochondrialen DNS-Synthese in mit HSV infizierten Raji-Zellen wird im Vergleich zu anderen Virus-Zellsystemen diskutiert.

## 6. LITERATUR

- 1) BORST, P.:  
Mitochondrial nucleic acids.  
Ann. Rev. Biochem. (1972) 333-376
- 2) COOTE, J.L., WORK, T.S.:  
Proteins coded by mitochondrial DNA of mammalian cells.  
Eur. J. Biochem. 23, (1971) 564-574
- 3) DUBBS, D.R., KIT, S.:  
Mutant strains of herpes simplex deficient in Thymidine kinase inducing activity.  
Virology 22, (1964) 493-502
- 4) EPSTEIN, M.A., ACHONG, B.G., BARR, Y.M., ZAJAC, B., HENLE, G., HENLE, W.:  
Morphological and virological investigations on cultured Burkitt tumor lymphoblasts (strain Raji).  
J. Nat. Cancer Inst. 37, (1966) 547-559
- 5) GERBER, P., HOYER, B.H.:  
Induction of cellular DNA synthesis in human leucocytes by EBV.  
Nature 221, (1971) 46-47
- 6) GERGELY, L., KLEIN, G., ERNBERG, I.:  
Host cell macromolecular synthesis in cells containing EBV-induced early antigenes, studied by combined immunfluorescence and radioautography  
Virology 45, (1971) 22-29

- 7) GRIFFITHS, D.E., LANCASHIRE, W.E., ZANDERS, E.E.:  
Evidence for an extrachromosomal element involved in mitochondrial function: a mitochondrial episome?  
Febs Letters 53, (1975) 126-130
- 8) HENLE, W., HENLE, G., ZUR HAUSEN, H.:  
Effekt of herpes simplex virus on cultured Burkitt tumor cells and its failure to influence the epstein barr virus carrier state.  
Cancer Res. 29, (1969) 489-494
- 9) HENLE, W., HENLE, G., ZAJAC, B.A., PEARSON, G., WAUBKE, R., SCRIBA, M.:  
Differential reactivity of human serums with early antigens induced by epstein barr virus.  
Science 169, (1970) 188-190
- 10) HIRT, B.:  
Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures.  
J. Mol. Biol. 26, (1967) 365-369
- 11) KAPLAN, A.S., BEN-PORAT, T.:  
The pattern of viral and cellular DNA synthesis in pseudorabies virus infected cells in the logarithmic phase of grow.  
Virology 19, (1963) 205-214
- 12) KARA, J., MACH, O., CERNÁ, H.:  
Replication of Rous sarcoma virus and the biogenesis of the oncogenic subviral ribonucleoprotein particles (viroosomes) in the mitochondria isolated from the Rous sarcoma tissue.  
Biochem. Biophys. Res. Comm. 4, (1971) 162-170

- 13) KLEIN, G., DAMBOS, L., GOTHOSKAR, B.:  
Sensitivity of Epstein-Barr virus producer  
and nonproducer human lymphoblastoid cell  
lines to superinfection with EBV.  
Int. J. Cancer 10, (1972) 44-47
- 14) KÜNTZEL, H.:  
Intrinsic membrane protein encoded by mito-  
chondrial DNA in *neurospora crassa*.  
Hoppe-Seylers Zeitschrift für Physiologische  
Chemie 3, (1975) 250-254
- 15) LEVINE, A.J.:  
Induction of mitochondrial DNA synthesis in  
monkey cells infected by simian virus 40 and  
(or) treated with calf serum.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, (1971) 717-720
- 16) LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L.,  
RANDALL, R.J.:  
Protein measurement with the folin phenol  
reagent.  
J. Biol. Chem. 193, (1951) 265-275
- 17) LUNGER, P.D., CLARK, H.F.:  
Ultrastructural studies of cell-virus inter-  
action in reptilian cell lines. I. Intramito-  
chondrial viruses in "C-type" virus producing  
VSW cells.  
J. Nat. Cancer Inst. 50, (1973) 111-115
- 18) NASS, M.M.K.:  
Mitochondrial DNA: Advances, problems and goats.  
Science Vol 165, (1969) 25-37

- 19) NASS, M.M.K.:  
Temperature dependent formation of dimers and oligomers of mitochondrial DNA in cells transformed by a thermosensitive mutant of rous sarcoma virus.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, (1973) 3739-3743
- 20) OJALA, D., ATTARDI, G.:  
Identification and partial charakterisation of multiple discrete polyadenylic acid, containing RNA components coded for by HeLa cell mitochondrial DNA.  
J. Mol. Biol. 88, (1974) 105-219
- 21) PONTÉN, J.:  
Virology monographs 8: Spontaneous and virus induced transformation in cell culture  
Springer Verlag Wien, New York 1971
- 22) RADSACK, K., FREISE, H.:  
Stimulation of mitochondrial DNA synthesis in HeLa cells by herpes simplex virus.  
Live Science 11, (1971) 717-720
- 23) SEBALD, W., SCHWAB, A.J., BÜCHER, TH.:  
Cycloheximide resistant amino acid incorporation into mitochondrian protein from neurospora crassa in vivo.  
Febs Letters Vol. 4, (1969)
- 24) STORRIE, B., ATTARDI, G.:  
Expression of the mitochondrial genome in HeLa cells. XIII, effekt of selective inhibition of cytoplasmic or mitochondrial nucleic acid synthesis.  
J. Mol. Biol. 71, (1972) 177-199

- 25) VESCO, C., BASILICO, C.:  
Induction of mitochondrial DNA synthesis by  
polyoma virus.  
Nature 229, (1971) 336-338
- 26) RADSAK, K., ALBRING, H.:  
Stimulation of mitochondrial DNA synthesis  
as an early function of herpes simplex virus.  
Febs Letters 44, (1974) 136-141

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren  
und Dozenten:

in Marburg:

Amon, Berendes, Bommer, Braasch, Brück, Buchholz,  
Dimroth, Dölle, Englhardt, Eissner, Exner, Friederich,  
Ganz, Golenhofen, Graul, Hamelmann, Hensel, Hess,  
Hildebrandt, Heuser, Hort, Jakob, Kaffarnik, Karlson,  
Klaus, Koecke, Koransky, Korb, Kühnel, Linneweh,  
Mahr, Mann, Martini, Nesswetha, Nöth, Nultsch, Petry,  
Pots, Reim, Rodeck, Rohen, Schleyer, Schmitz-Moormann,  
Schmid, Seidel, Siegert, Straub, Strohmeyer, Stuke,  
Uhlarik, Vakilzadeh, Walcher, Wendt.

Herrn Prof. Dr. med. R. Siegert bin ich für die Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes im Hygiene-Institut der Universität Marburg zu Dank verpflichtet.

Herrn Dr.med. habil. K. Radsak danke ich für die Beratung und Unterstützung bei der Einarbeitung in die Methodik und Problematik und für so manche praktische Anregungen.

Frau Willutzki habe ich für die technische Unterstützung zu danken.

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Universität Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel: Mitochondriale DNS-Synthese in lymphoblastoiden Zellen nach lytischer Infektion mit Herpes Simplex Virus Typ 1 und abortiver Infektion mit Epstein-Barr Virus im Hygiene-Institut der Universität Marburg unter Leitung von Prof. Dr. med. R. Siegert mit Unterstützung durch Dr. med. habil. K. Radsak ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit zur Dissertation vorgelegt. Auszüge aus der vorliegenden Arbeit wurden in Med. Microbiol. Immunol. 159, (1973) 45-51 veröffentlicht.

Regensburg, den 30. April 1977

(Hans-Werner Freise)

## LEBENS LAUF

Am 10. November 1947 wurde ich als Sohn des selbständigen Kaufmannes Werner Freise und seiner Ehefrau Johanna, geb. Eichner, in Regensburg geboren.

Vom 01.09.1954 bis 15.07.1958 besuchte ich die Engelbergerschule in Regensburg. Am 01.09.1958 trat ich in das mathematisch-naturwissenschaftliche Goethe-Gymnasium in Regensburg über, an dem ich am 21.07.1967 die Reifeprüfung ablegte.

Vom 09.10.1967 bis 15.02.1974 studierte ich im Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg. Nach bestandenem Physikum erhielt ich im Hygiene-Institut der Universität Marburg das Dissertationsthema.

Nach Abschluß des medizinischen Staatsexamens im Januar 1974 war ich vom 01.03.1974 bis 30.06.1974 im Evangelischen Krankenhaus Regensburg bei Herrn Chefarzt Dr. med. W. Stietzel auf der chirurgischen Abteilung als Medizinalassistent tätig. Vom 01.09.1974 bis 30.05.1975 arbeitete ich als Medizinalassistent bei Herrn Prof. Dr. med. H. Mathies in der I. Medizinischen Klinik des Rheumazentrums Bad Abbach.

Am 09.05.1975 wurde mir die Approbation als Arzt erteilt.

Am 02.06.1975 wurde ich als wehrpflichtiger Stabsarzt zur Bundeswehr eingezogen. Mein Wehrdienst endete am 31.08.1976.

Seit 01.10.1976 bin ich im Kreiskrankenhaus Roding als Assistenzarzt auf der Abteilung für Innere Medizin bei Herrn Chefarzt Dr. med. W. Kampe tätig. Mein weiteres berufliches Ziel ist der Facharzt für Innere Medizin.





